

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi pangan Universitas Muhammadiyah Malang. Kegiatan ini dimulai pada bulan Maret 2018 sampai dengan bulan Juli 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada pembuatan *yoghurt* adalah sendok, pisau, timbangan digital (camry model: EK5055), botol kaca, pengaduk, kain saring, saringan, seperangkat alat kaca (*glassware* IWAKI PYREX), *Autoclave*, *petridish*, *colony counter*, lemari asam, *laminary air flow*, *hot plate*, *beaker glass*, *erlenmeyer*, cawan *porselen*, timbangan analitik merk GR-200, *sentrifuge*, *tube sentrifuse*, spatula, pH meter tipe Lab 875 (SI Analytics), *color reader* CR-10 merk KONICA MINOLTA, oven merk WTC Binder 7200 tipe E53 no. 89749, bunsen, pipet ukur, pipet tetes, *vortex*, desikator, corong, kertas saring, kertas label, kapas, *tissue*, *waterbath*, gelas ukur, buret plastik, dan plastik PP.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada pembuatan *yoghurt* adalah bunga telang ungu segar yang didapat dari petani di Desa Badas, Pare, Kediri. Kultur bakteri asam laktat menggunakan kultur komersil merk “jobadi”, gula pasir, susu skim, kedelai lokal varietas Anjasromo yang dibeli di BALITKABI Malang, susu sapi yang didapat dari peternak di Desa Junrejo – Batu.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk Analisa *yoghurt* adalah aquades, asam sitrat, folin, petroleum benzene, MRS agar dan PDA (*potato dextrose* agar

39g/lt), NaOH 0,1 N, indikator PP (*Fenolftalein*), serbuk DPPH (2,2 – diphenyl – 1 pycrilhidrazine), methanol 70%, KCl, HCl 37%, Na-asetat yang diperoleh dari Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan UMM.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari satu tahapan yaitu proses fermentasi *yoghurt*. Selanjutnya, dilakukan rancangan penelitian dengan menggunakan Rancangan Tersarang (*Nested*), yang terdiri atas dua faktor. Faktor I adalah variasi substitusi sari kedelai dengan 4 level (Susu Sapi 100%, Susu Sapi:Sari Kedelai [75:25], Susu Sapi:Sari Kedelai [50:50], dan Susu Sapi:Sari Kedelai [25:75]). Faktor II adalah variasi konsentrasi pigmen bunga telang dengan 3 level (0%, 5%, dan 10%), sehingga diperoleh 12 kombinasi perlakuan yang dianalisa sebanyak 3 kali ulangan.

Faktor I: Substitusi Sari Kedelai (K)

K0: Susu Sapi 100%

K1: Susu Sapi:Sari Kedelai (75:25)

K2: Susu Sapi:Sari Kedelai (50:50)

K3: Susu Sapi:Sari Kedelai (25:75)

Faktor II: Konsentrasi Pigmen Bunga Telang (T)

T0: 0% (v/v)

T1: 5% (v/v)

T2: 10% (v/v)

Tabel 4 Matriks Kombinasi Perlakuan

K0			K1			K2			K3		
T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
K0T0	K0T1	K0T2	K1T0	K1T1	K1T2	K2T0	K2T1	K2T2	K3T0	K3T1	K3T2

Keterangan:

K0T0: Susu sapi 100% dan pigmen bunga telang 0%

K0T1: Susu sapi 100% dan pigmen bunga telang 5%

K0T2: Susu sapi 100% dan pigmen bunga telang 10%

K1T0: Susu sapi : sari kedelai (75:25) dan pigmen bunga telang 0%

K1T1: Susu sapi : sari kedelai (75:25) dan pigmen bunga telang 5%

K1T2: Susu sapi : sari kedelai (75:25) dan pigmen bunga telang 10%

K2T0: Susu sapi : sari kedelai (50:50) dan pigmen bunga telang 0%

K2T1: Susu sapi : sari kedelai (50:50) dan pigmen bunga telang 5%

K2T2: Susu sapi : sari kedelai (50:50) dan pigmen bunga telang 10%

K3T0: Susu sapi : sari kedelai (25:75) dan pigmen bunga telang 0%

K3T1: Susu sapi : sari kedelai (25:75) dan pigmen bunga telang 5%

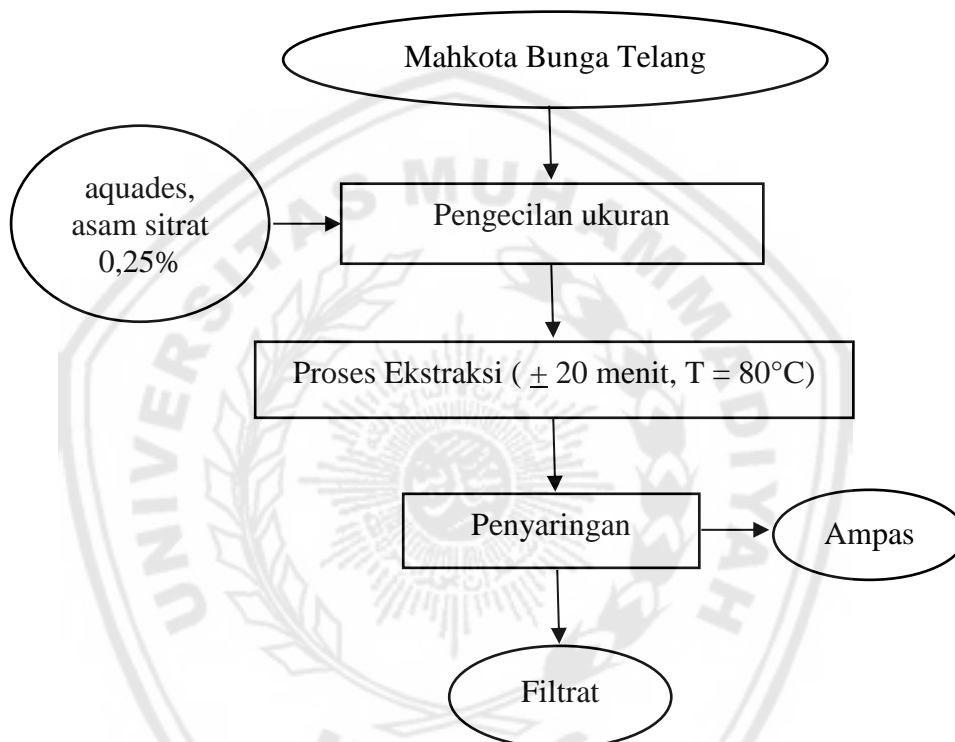
K3T2: Susu sapi : sari kedelai (25:75) dan pigmen bunga telang 10%

3.4 Prosedur Penelitian

Pembuatan *yoghurt* dengan substitusi sari kedelai dan penambahan pigmen bunga telang terdiri dari tiga proses, yaitu ekstraksi pigmen alami, pembuatan sari kedelai dan pengaplikasian pada *yoghurt*. *Yoghurt* yang dihasilkan dilakukan analisis antara lain pH, total asam laktat, total BAL, intensitas warna, viskositas, aktivitas antioksidan, kadar lemak, kadar protein, dan uji organoleptik menggunakan uji *hedonic scale* yang meliputi rasa, aroma, kenampakan, dan kesukaan.

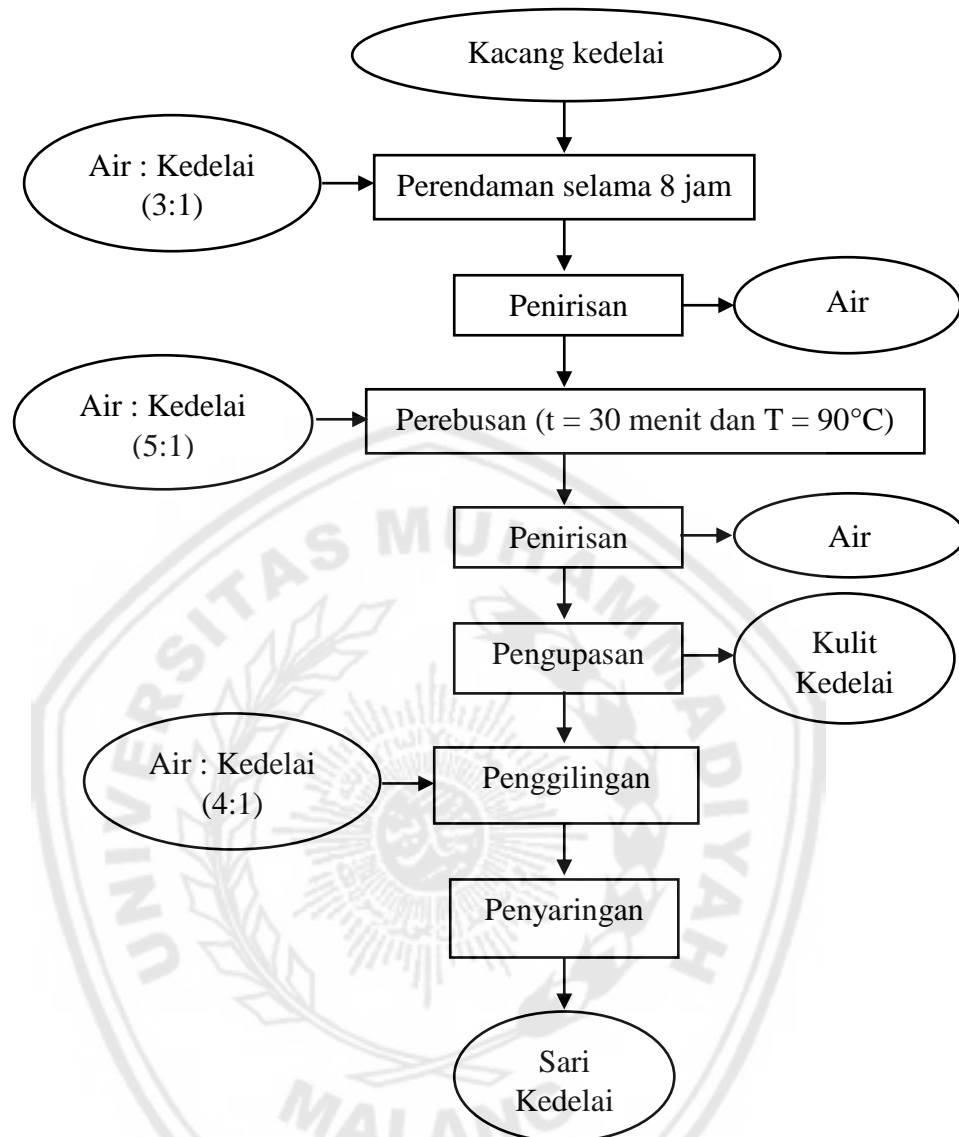
3.4.1 Pembuatan Pigmen Bunga Telang

Bunga telang disortir dan dibersihkan kemudian diambil mahkota bunganya. Setelah itu dikecilkan ukuran, ditambahkan dengan aquades, dan asam sitrat. Proses ekstraksi selama ± 20 menit, suhu 80°C . Hasil ekstraksi tersebut disaring menggunakan kain saring. Selanjutnya filtrat dimasukkan kedalam botol kaca dan ditutup dengan alumunium foil.



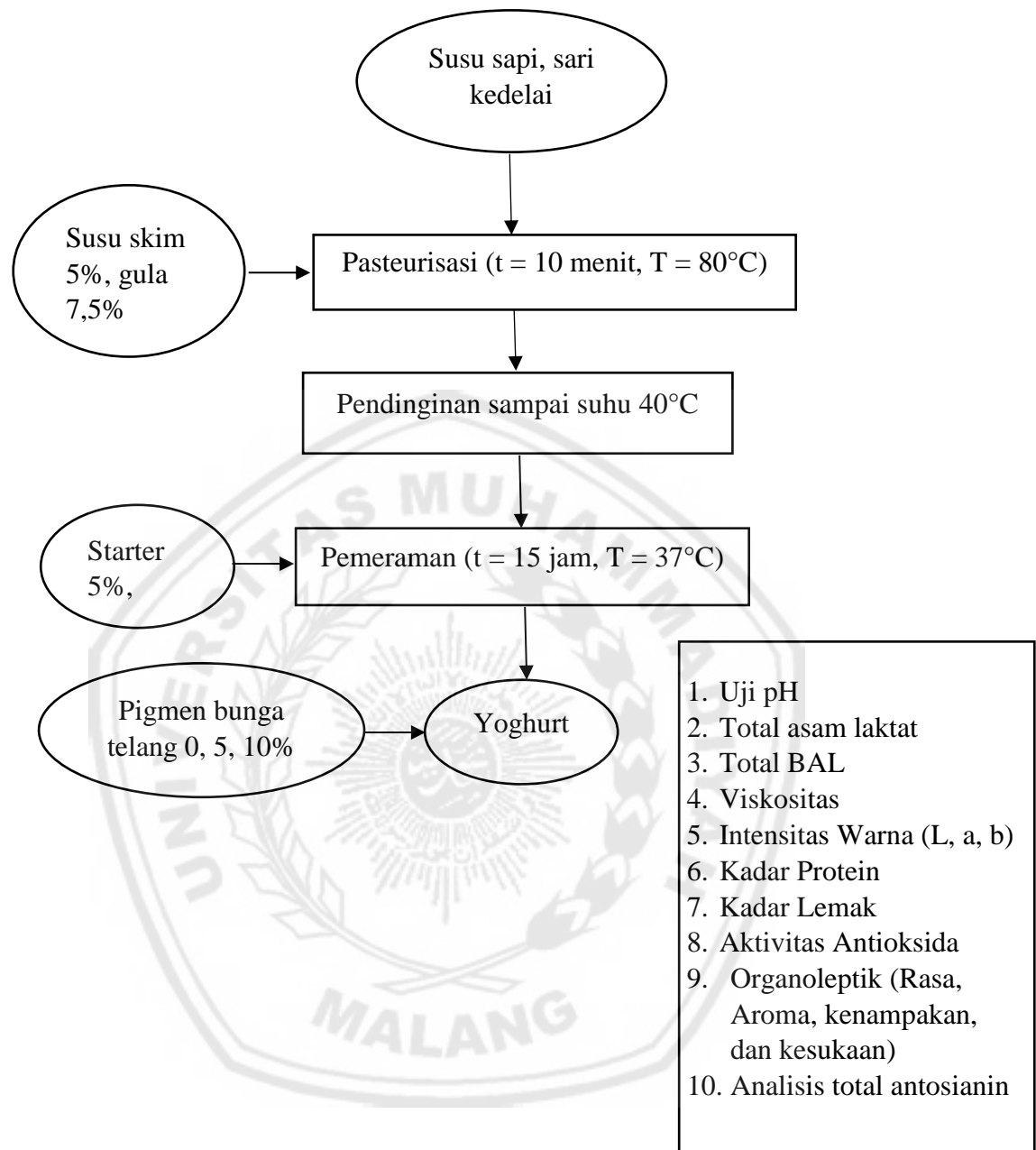
Gambar 4 Diagram Alir Ekstraksi Pigmen Bunga Telang (Saati, 2006)

3.4.2 Pembuatan Sari Kedelai



Gambar 5 Diagram Alir Pembuatan Sari Kedelai (Amrin, 2005 dengan modifikasi)

3.4.3 Pembuatan *Yoghurt*



Gambar 6 Diagram Pembuatan *Yoghurt* (Jaya, dkk., 2011)

3.5 Parameter Pengamatan

Pengamatan uji bahan baku dilakukan pada susu sapi, sari kedelai, dan pigmen bunga telang. Adapun parameter pengamatan yang dilakukan pada bahan baku susu sapi dan sari kedelai, yaitu kadar protein, kadar lemak, dan total padatan

terlarut. Sedangkan pada pigmen bunga telang, parameter yang dilakukan, yaitu kadar air, kadar gula, pH, total antosianin, dan total padatan terlarut.

Adapun parameter pengamatan yang dilakukan pada penelitian kajian penambahan ekstrak bunga telang serta substitusi sari kedelai terhadap karakteristik *yoghurt*, yaitu pH, Total Asam Laktat, Total BAL, intensitas warna, viskositas, aktivitas antioksidan, kadar lemak, kadar protein, dan uji organoleptik menggunakan uji *hedonic scale* yang meliputi rasa, aroma, kenampakan, dan kesukaan.

3.5.1 Uji pH (Badan Standarisasi Nasional, 2004)

1. Menyalakan pH meter;
2. Membilas elektroda dan *temperature prob* menggunakan akuades dan mengeringkannya;
3. Melakukan kalibrasi dengan mencelupkan elektroda pada larutan penyangga (pH 7) serta asam (pH 4) dan membersihkannya;
4. Membilas kembali elektroda menggunakan akuades dan mengeringkan;
5. Mencelupkan elektroda pada sampel, dengan menekan tombol *Ar (hold)* dan *Enter* kemudian menunggu pembacaan pada layar stabil serta muncul *indicator autolock* pada layar;
6. Mencatat nilai yang tertera pada layar digital.

3.5.2 Total Asam Laktat (AOAC, 1995)

1. 10 g sampel dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas, selanjutnya dihomogenkan dan disaring;
2. Filtrat diambil 10 mL dan dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer*, tambahkan 2- 3 tetes indikator PP (*Fenolftalein*);

3. Titrasi dengan larutan NaOH 0,10 N hingga warna larutan berubah menjadi merah muda dan warna tersebut tidak berubah kembali selama 30 detik;
4. Hitung jumlah NaOH yang digunakan dengan rumus:

$$\text{Total asam laktat (\%)} = \frac{\text{Vol. NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{fp} \times \text{BM}}{\text{Berat sampel (mg)}} 100\%$$

3.5.3 Uji Total BAL (Bakteri Asam Laktat) (Fardiaz, 1992)

1. Menyiapkan seri pengenceran, tabung diisi 0,9 mL aquades steril 10 buah;
2. Dipipet 0,1 mL sampel cair (sampel padat ditimbang dan diencerkan) dan dihomogenkan pada tabung pengenceran. Kemudian diambil 10 mikron liter untuk ditanam secara *droop* (tetes) ke media MRS Agar dan diberi tanda pada bagian bawah media dalam *petri disk* dengan spidol permanen (Pengenceran 10^{-1});
3. Mengambil hasil pengenceran 0,1 mL untuk dihomogenkan dengan tabung pengenceran yang lain, diambil 10 mikron liter untuk ditanam dan 0,1 mL untuk diencerkan selanjutnya, sampai pengenceran yang dikehendaki, misalnya sampai 10^{-7} ;
4. Media yang telah ditanami dibiarkan selama 10 menit, agar tetesan cairan meresap dalam media;
5. Diinkubasi selama 6 jam dalam suhu optimal posisi *Petri disk* dibalik;
6. Dilihat dengan *mikroskop gross* dan dipilih sebaran koloni yang dapat dihitung pada pengencerannya.

3.5.4 Uji Intensitas Warna (Hutchings, 1999)

1. Mengaktifkan color reader dengan menekan tombol on;

2. Mengawali pengukuran dengan standarisasi alat menggunakan keramik standar yang memiliki nilai L, a dan b dimana L adalah kecerahan, nilai positif berarti cerah nilai negatif berarti suram, a adalah kemerahan nilai positif berarti merah nilai negatif berarti hijau, b adalah kekuningan nilai positif berarti kuning dan nilai negatif berarti biru;
3. Menempelkan ujung lensa alat pada permukaan sampel yang akan diamati dan mengukur warnanya tekan tombol target;
4. Mencatat hasil pengukuran intensitas warna.

3.5.5 Analisa Viskositas (AOAC, 1995)

Spindle dipasang pada lengan spindle. Spindle dimasukkan ke dalam sampel yang diuji. Motor dihidupkan sehingga spindle berputar dan jika jarum dial menunjukkan angka stabil motor dimatikan. Mencatat angka yang ditunjukkan oleh jarum dial, setiap sampel diukur 5 kali kemudian diambil rata-rata. Nilai rata-rata dikalikan dengan faktor pengali yang sesuai dengan kecepatan dan nomor spindle yang dipakai merupakan nilai kekentalan produk yang diuji.

3.5.6 Analisa Kadar Lemak (Sudarmadji, dkk., 2007)

Penentuan kadar lemak dengan menggunakan metode hidrolisis asam prosedurnya adalah :

1. Sampel ditimbang 2 g, tambahkan 4 mL etanol 96% dan tambahkan lagi HCl 10 mL (25 HCl + 11 aquades). Sebelumnya menyiapkan cawan porselin yang kosong dan ditimbang beratnya;
2. sampel diletakkan ke dalam *waterbath* pada suhu 70°C selama 30-40 menit, kemudian tambahkan 10 mL etanol 96% dan dinginkan;

3. sampel ditambahkan dengan *petroleum* eter sebanyak 25 mL kemudian di vortex selama 1 menit;
4. sampel dimasukkan kedalam corong pisah, kemudian terjadi 2 lapisan cairan. Untuk lapisan bawah dibuang dan lapisan atas diambil;
5. sampel dimasukkan kedalam oven selama 30 menit kemudian ditimbang beratnya;
6. hitung kadar lemak dengan rumus:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{\text{Berat Akhir} - \text{Berat Cawan}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

3.5.7 Analisa Kadar Protein Metode Lowry (Sudarmadji, dkk., 2007)

A. Pereaksi

1. Larutan natrium karbonat 2% dalam larutan NaOH 0,1 N pereaksi (1);
2. tembaga sulfat 0,5% dalam larutan NaK tatrak 1% pereaksi (2) (dibuat hanya pada waktu akan digunakan);
3. campuran 50 mL pereaksi (1) dengan 1 mL pereaksi (2) (hanya pada waktu akan digunakan, hanya stabil selama 1 hari);
4. pereaksi folin Ciocalteu (pereaksi fenol). Biasa tersedia secara komersil, larutkan dengan air 1:1 sebelum digunakan (3);
5. larutan protein standar 0,25 mg/mL (larutan borin albumin) (4).

B. Pembuatan Kurva Standar

1. Masukkan kedalam tabung reaksi: 0 (blanko), 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 dan 1,0 mL protein standar. Tambahkan aquades sampai volume total masing-masing 4 mL;
2. tambahkan 5,5 mL pereaksi (3) ke dalam masing-masing tabung reaksi, campur merata dan biarkan selama 10 – 15 menit pada suhu kamar;

3. tambahkan 0,5 mL pereaksi (4) ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat setelah penambahan. Biarkan selama kurang lebih 30 menit sampai warna biru terbentuk;
4. ukur absorbansi pada panjang gelombang 650 nm dengan menggunakan spektrofotometer; dan buat kurva standar.

C. Pengukuran Sampel

1. Sampel disaring lalu disentrifuse. Supernatan kemudian ditambahkan air sampai volume total masing-masing 1 mL;
2. Ke dalam masing-masing tabung reaksi tambahkan 1 mL Trichloro Acetic Acid (TCA) 10%. Sentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap, supernatant dibuang dengan cara dekantansi;
3. Ke dalam endapan tambahkan 2 mL etil eter, campur merata, kemudian sentrifuse kembali. Ini akan menolong menghilangkan residu TCA. Biarkan mengering pada suhu kamar;
4. Ke dalam endapan kering ditambahkan 4 mL air, campur merata. Tambahkan 6 mL pereaksi Biuret.
5. Ambil sampel 1mL dan tambahkan aquades sampai volume total masing-masing 4 mL;
6. Tambahkan 5,5 mL pereaksi (3) ke dalam masing-masing tabung reaksi, campur merata dan biarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar;
7. Tambahkan 0,5 pereaksi (4) ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat setelah penambahan;
8. Biarkan selama kurang lebih 30 menit sampai warna biru terbentuk;
9. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

3.5.8 Analisa Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (Yue & Xu, 2008)

Prinsip dari uji DPPH adalah penghilangan warna untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung menjangkau radikal DPPH, yang dilihat dari absorbansi pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Adapun tahapan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sebagai berikut:

A. Pembuatan Larutan DPPH 0,25 mM

1. Menghitung kebutuhan serbuk DPPH dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{Mr} \times \text{Volume (L)}}$$

2. Melarutkan serbuk DPPH dengan methanol 70% pada labu uku 50 mL hingga batas tera, dan menghomogenkannya;
3. menyimpan larutan DPPH pada kondisi gelap dan tertutup rapat pada kondisi dingin, serta sesegera mungkin untuk digunakan.

B. Ekstraksi Bahan Aktif

1. Menimbang sampel sebanyak 1 gram ke dalam *tube centrifuge*;
2. menambahkan larutan methanol 70% sebanyak 9 mL;
3. melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit;
4. memisahkan supernatant untuk uji aktivitas antioksidan.

C. Analisis Aktivitas Antioksidan

1. Mengambil supernatant sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi;
2. menambahkan 2 mL larutan DPPH 0,25 mM dan menghomogenkannya;
3. menutup mulut tabung dengan *plastic wrap*, dan badan tabung dengan alumunium foil;
4. menyimpan sampel pada kondisi gelap selama 30 menit;

5. membaca serapan panjang gelombang dengan spektrofotometer UV Vis pada $\lambda = 517 \text{ nm}$;
6. menghitung % inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$

3.5.9 Analisa Total Antosianin Metode pH Differential (AOAC, 2005)

Prinsip analisis kadar antosianin dengan metode perbedaan nilai pH adalah penentuan total antosianin monomer konten, berdasarkan perubahan struktur kromofor antosianin pada pH 1 dan pH 4,5. Pada pH 1, antosianin secara keseluruhan berbentuk kation flavillum atau oxonium yang berwarna. Sedangkan pada pH 4,5 antosianin berbentuk karbinol atau hemikal yang tidak berwarna (Tensiska & Sukarminah, 2007).

A. Pembuatan Larutan Buffer

1. Buffer pH 1

Larutan KCl : 0,025 M KCl (1,86 gram dalam 980 mL akuades)

Untuk membuat buffer pH 1, sebanyak 980 mL larutan KCl 0,025 M ditambahkan dengan 6,3 mL HCl 37%.

2. Buffer pH 4

Larutan Na-asetat : 0,4 M larutan Na-asetat (54,43 gram dalam 960 mL akuades)

Untuk membuat buffer pH 4,5, sebanyak 960 mL larutan Natrium Asetat 0,4 M ditambahkan dengan 20 mL HCl 37%.

B. Penentuan Total Antosianin

1. Melarutkan sampel dalam pelarut metanol asam dengan perbandingan (1:1) ke dalam *beaker glass*;

2. menghomogenkan larutan sampel, dan menurup seluruh bagian wadah dengan alumunium foil;
3. melakukan maserasi sampel pada suhu -23°C selama 1 jam;
4. memasukkan sebanyak 1mL masing-masing ke dalam 2 buah tabung reaksi. Menambahkan tabung reaksi pertama dengan larutan buffer pH 1 sebanyak 9 mL dan tabung reaksi kedua ditambahkan larutan buffer pH 4,5 sebanyak 9 mL;
5. melakukan scanning antosianin dengan rentang panjang gelombang 400 nm – 550 nm pada kedua buffer larutan sampel ekstrak untuk mengetahui panjang gelombang maksimal antosianidin yang dimiliki oleh sampel ekstrak;
6. selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal dan panjang gelombang 700 nm pada masing-masing sampel dan hasilnya dikalkulasi berdasarkan persamaan berikut:

$$A = (A_{\text{vis-maks}} - A_{700\text{nm}})_{\text{nilaipH1}} - (A_{\text{vis-maks}} - A_{700\text{nm}})_{\text{nilaipH4,5}}$$

$$\text{Konsentrasi antosianin (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Keterangan:

A = Absorbansi

MW = *Molecular Weight* (Berat Molekul sianidin glukosida = 449,2)

DF = *Dillution factor* (factor pengenceran = 10 mL/ 0,1 mL)

ϵ = Absortivitas molar/koefisien ekstingsi molar (29.600 L cm⁻¹)

l = lebar kuvet (1 cm)

3.5.10 Uji Organoleptik (Rahayu, 2001)

Analisis organoleptik dilakukan untuk mengetahui daya terima produk *yoghurt* oleh konsumen melalui beberapa parameter. Parameter yang diujikan pada uji ini adalah kesukaan terhadap rasa, aroma, dan kenampakan. Analisis

organoleptik ini menggunakan metode *Hedonic Test*. Metode ini memungkinkan para panelis untuk memberikan nilai terhadap tingkat kesukaan pada masing-masing parameter. Kisaran nilai yang ada pada skala *hedonic* berkisar antara nilai 1-5 pada skala *numeric* untuk masing-masing parameter. Semakin tinggi nilai yang diberikan maka semakin tinggi pula tingkat kesukaan konsumen. Masing-masing sampel akan diberikan kode yang berbeda, untuk menghindari terjadinya perbandingan tingkat kesukaan panelis antar sampel. Pengujian kesukaan ini menggunakan panelis yang tidak terlatih dengan jumlah minimal 30 orang.

Tabel 5 Skor Organoleptik

Nilai	Rasa	Aroma	Kenampakan	Kesukaan
1	Sangat Tidak Asam	Sangat tidak menyengat	Sangat Tidak Kental	Sangat Tidak Suka
2	Tidak Asam	Tidak menyengat	Tidak Kental	Tidak Suka
3	Cukup Asam	Cukup Menyengat	Cukup Kental	Cukup Suka
4	Asam	Menyengat	Kental	Suka
5	Sangat Asam	Sangat Menyengat	Sangat Kental	Sangat Suka

3.5.11 Analisis Data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5 %. Apabila terjadi perbedaan nyata atau interaksi pada masing-masing perlakuan maka data yang diperoleh akan dilanjutkan dengan uji perbandingan menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) 5% De Garmo *et al* (1984).